

## 2004/05/07

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



る調節のもとで肺の生理的な機能の調節が行われている。特に神経伝達物質は脳内の様々な部位に存在し、それぞれに対応するレセプターを通じてその生理機能の調節を行っている。脳内には未だ未知の神経伝達物質も多く、そのレセプター蛋白質も多くの多いと考えられる。これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在するかどうかについても分かっていなかった。さらにまた肺などの呼吸器系の器官でも、多くのホルモン、ホルモンなどの呼吸器系あるいは生理活性物質などによる調節のもとで呼吸器系の生理的な機能の調節が行われている。特に肺ではこれらの生理活性物質などが多く存在し、血圧、呼吸活動等それぞれに対応するレセプターを通じてその調節機能を果たしている。また、肺では未知の生理活性物質なども多く存在すると思われ、当然そのレセプター蛋白質もDNAの構造に関しても、これまで報告されていないものも多いと考えられる。さらに、既知のレセプター蛋白質のサブタイプが存在することも考えられる。

【0004】 肺における複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレセプターとの関係を明らかにすることは、医薬品開発に非常に重要な手段である。また、レセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、肺内で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を明らかにし、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。さらに肺などの呼吸器系における複雑な機能を調節する物質と、その特異的なレセプターとの関係を明らかにすることは、これまた医薬品開発に非常に重要な手段である。特に肺などの呼吸器系の機能を調節するためのレセプター蛋白質に対するアゴニスト、アンタゴニストを効率よくスクリーニングし、医薬品を開発するためには、肺で発現しているレセプター蛋白質の遺伝子の機能を明らかにし、それらを適当な発現系で発現させることが必要であった。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、ヒト肺由来およびヒト肺由来の新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質、該蛋白質をコードするDNAを含有するDNA、該蛋白質の製造方法および該蛋白質およびDNAの用途等を提供するものである。本発明は、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有するペプチド、該ペプチドで形質転換された宿主、該形質転換体から得られた細胞成分画、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその発現細胞（核形質転換体を含む）を用いるG蛋白質共役型レセ

ターに対するリガンドの測定方法、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその発現細胞を用いるG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法、該スクリーニング用キット、該スクリーニングにより得られたアゴニストまたはアンタゴニスト、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを含有する医薬、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する抗体、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質あるいはその抗体を用いた免疫アッセイ技術、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質およびそのDNAの用途などを提供するものである。

【0006】

【課題を解決するための手段】 近年、G蛋白質共役型レセプター蛋白質が、その構造の一部にアミノ酸配列の類似性を示すことを利用して、ポリメラゼ・チェーン・リリアソソ（Polymerase Chain Reaction）以下、PCRと略称する）法によって新規レセプター蛋白質を探索する方法が行われるようになった。本発明者らは、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを合成し、該DNAを用いてヒト肺由来のcDNAおよびヒト肺由来のcDNAを増幅し、その解析を進めた。その結果、本発明者らは、新規G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを単離し、その部分的な構造を決定することに成功した。これらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質cDNAは、既知のG蛋白質共役型レセプターと、DNAおよびアミノ酸の相似性が認められ、さらにヒトで機能発現している新規のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードしていると考えられた。本発明者らが行ったG蛋白質共役型レセプター蛋白質をヒト肺およびヒト肺より単離したことにより、これらのG蛋白質共役型レセプター蛋白質はそれぞれヒトの肺内およびヒトの肺において発現し、何らかの働きを担っていることが示唆される。これらのことから、これらのレセプター蛋白質は、それぞれヒトの肺内およびヒトの肺で発現し、機能していると考えられる。このDNAを用いれば、完全長の細胞株を持つcDNAを入手することができ、該レセプター蛋白質を製造することもできる。また、該cDNAをプライマーあるいはプローブとして用いてヒト組織や細胞からヒト由来のcDNAをクローニングすることもできる。さらに、該G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするcDNAを適当な手段で発現させた該レセプター蛋白質を用いれば、レセプター結合実験または細胞内セカンドメッセンジャーの測定等を指標に、生体内あるいは天然・非天然の化合物などから該レセプター蛋白質に対するリガンドをスクリーニングすることができる。さらに、リガンドとレセプター蛋白質との結合性を変化させる化合物、例えば、リガンドとレセプター蛋白質との結合を阻害する化合物、あるいはリガンドとレセプター蛋白質との結合を促進する化合物

などのスクリーニングを行なうこともできることを見出した。

【0007】 より具体的には、本発明者らは、ヒト肺由来の新規なcDNA断片として（図1）に示すものをPCR法によって増幅し、サブクローニングし、そうして得られた配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることが明らかになった。この配列をアミノ酸配列（配列番号：1）に翻訳したところ（図1）、第2、第3、第4、第5、第6及び第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された（図2）。また、増幅されたcDNAのサイズも、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比較して同程度の約700bpであった。本発明者らは、このDNAの塩基配列を断片としてデーターベース検索を行ったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ1（P30872）、ヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ2（P30873）およびヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ3（P32745）とそれぞれアミノ酸配列で36%、37%および41%のホモロジーが認められた（図3）。上記の（ ）内の配列は、NCBI/PIR/Swiss-Protにデータとして登録される際の登録番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるものである。

【0008】 さらに、本発明者らは、ヒト肺由来の新規なcDNA断片として（図4）に示すものをPCR法によって増幅し、サブクローニングし、その配列の解析から、該cDNAが新規レセプター蛋白質をコードしていることが明らかになった。この配列をアミノ酸配列（配列番号：2）に翻訳したところ（図4）、第2、第3、第4、第5、第6及び第7膜貫通領域が疎水性プロット上で確認された（図5）。また、増幅されたcDNAのサイズも、既知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質と比較して同程度の約700bpであった。本発明者らは、このDNAの塩基配列を断片としてデーターベース検索を行ったところ、公知のG蛋白質共役型レセプター蛋白質であるヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ2（P30874）、ヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ3（P32745）およびヒトのソラスチンレセプター・サブタイプ1（P30872）とそれぞれアミノ酸配列で38%、41%および39%のホモロジーが認められた（図6）。上記の（ ）内の配列は、NCBI/PIR/Swiss-Protにデータとして登録される際の登録番号であり、通常Accession Numberと呼ばれるものである。

【0009】 すなわち、本発明は、（1）配列番号：1または配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩あるいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、（2）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩を含有するDNA、（3）配列番号：3または配列番号：4で表わされる塩基配列を有する第（2）項記載のDNA、（4）第（2）または（3）項記載のDNAを含有することを特徴とするペプチド、（5）第（4）項記載のペプチドを保持する形質転換体、（6）第（5）項記載の形質転換体を増殖し、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその部分ペプチドを生産させることを特徴とする第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の製造方法、（7）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩と、試験材料とを接触させることを特徴とする第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するリガンドの決定方法。

【0010】 （8）（1）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドを接触させた場合と（11）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に、リガンドおよび試験材料を接触させた場合との比較を行なうことを特徴とするリガンドと第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩をスクリーニングする方法、（9）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩を含有することを特徴とするリガンドと第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩との結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、（10）第（1）項記載のG蛋白質共役型レセプター蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩の結合性を変化させる化合物またはその塩のスクリーニング方法、（11）第（8）項記載のスクリーニング法または第（9）項記載のスクリーニング法を用いて得られたG蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニスト、（12）第（2）項記載のDNAをコードするG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNA、および（13）第（2）項記載のDNAをプライマーあるいはプローブとして用いてクローニングされたDNAに

よりコードされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩あるいは該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩を提供する。

【0011】 より具体的には、（14）蛋白質が、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列、（15）配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸



骨芽細胞、破骨細胞、星状細胞、メラニン細胞、各種の  
分泌細胞、上記と他の組織由来の細胞などであることを特  
徴とする上記第(37)項記載のDNAをスクリーニン  
グする方法を提供する。

【0016】さらに、本発明は(39)上記第(2)項記載のDNAにハイブリダイズすることのできることを特徴とする第(2)項記載のDNAの少なくとも一部に特異的な塩基配列を含有するアプタジンと相補的な塩基配列を含有する(40)第(1)項記載のG<sub>1</sub>S-DNAおよびRNA、(40)第(1)項記載のG<sub>1</sub>S-DNAおよびRNA一連台製し、くはその塩基配列を

蛋白質共役型システアミド蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対するモイクロン抗体、抗体、(41)第(1)項記載のG蛋白質共役型システアミド蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩に対する精製されたポリクロナル抗抗原断片、(42)第(1)上記第(10)項、第(40)項あるいは第(41)項記載の抗体と測定すべき試料とをインキュベーションし、抗原・抗体複合物を形成せしめ、(11)上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合物を検出することを特徴とするG蛋白質共役型システアミド蛋白質またはその部分ペプチドの検知のための免疫測定法、(43)第(1)上記第(1)項記載のG蛋白質共役型システアミド蛋白質もしくはその塩またはその部分ペプチドもしくはその塩と測定すべき試料とをインキュベーションし、抗原・抗体複合物を形成せしめ、(11)上記第(1)工程で形成された抗原・抗体複合物を検出することを特徴とするG蛋白質共役型システアミド蛋白質またはその部分ペプチドに対する抗体の検知のための免疫測定法、(44)医薬として許容される担体中にあることを特徴とする上記第(39)項記載のペプチドシステアミドおよびRNA、(45)1.5〜3

にもしくはその場で抗体を免疫し、(11) 感染受それ  
 た個体から得られた細胞を永代培養可能なものとしめ、  
 (12) の G 蛋白質発現型とセブター-蛋白質と反応する抗体  
 を産生する永代培養可能な細胞を選択し、そして (1  
 3) の G 蛋白質発現型とセブター-蛋白質と反応する抗体  
 を産生する永代培養可能な細胞を生産させることを特徴と  
 する第 (1) の項記載の G 蛋白質発現型とセブター-蛋白質  
 もしくはその塩またはその部分ペプチドにもしくはその塩  
 の生産するモノクローナル抗体を生産する方法を包括す  
 る。

【0017】

【神明の姿の形態】神明細則において、「冥的に同一」として真正白の活性、例えば、リガソドの結合活性、生理的な特性など、実質的に同じであることを意味する。アミノ酸の置換、欠失あるいはしばしばけりるペプチドの生理的な特性や化学的な特性に大きな変化を生ぜしめなければ、こうした場合でも置換、欠失あるいは挿入を施されたりペプチドは、そうした同一であるといはれる挿入のされにくいものと要約的に同一であるとされるであろう。該アミノ酸配列中のアミノ酸の実質的に同一な置換物としては、そのアミノ酸が属するこののクラスのうちのものでアミノ酸頭から選ぶことができる。非酸性（酸味性）アミノ酸としては、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニンなどが挙げられる。酸性（中性）アミノ酸としては、グルタミン、セリン、スレオニン、シスチン、チロシン、アスパラギン、グルタミンなどが挙げられる。間電荷をもつ（塩基性）アミノ酸としては、アルギニン、リジン、ヒスチニンなどが挙げられる。負電荷をもつ（酸性）アミノ酸としては、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられ

0の塩基配列を含有することを特徴とする上記第(3)の塩基配列。

9) 項記載のアンチセンスDNAおよびRNA、(4) 6) 上記第(3)9) 項記載のアンチセンスDNAまたはRNAと、G蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチドを発現している細胞とを接触せしめたことを特徴とするG蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチドの活性を制御、調節する方法、(47) 上記第(3)9) 項記載のアンチセンスDNAまたはRNAと、G蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有するDNAとを接触せしめることを特徴とするG蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチドの機能発現を制御、調節する方法、(48) 上記第(28) 項記載のG蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチドをコードするDNAもしくはその塩基配列を細胞に投与することを特徴とする第(1) 項記載のG蛋白質共役型シセター-蛋白質もしくはその塩基またはその部分ペプチドもしくはその塩基の欠乏症の改善あるいは治療方法、及び(49) (1) 上記第(1) 項記載のG蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその部分ペプチド

【0018】本発明のα蛋白質配型型レゾータ・蛋白質としては、温血動物（例えば、モルモット、ラット、マウス、サル、ヒツジ、ウシ、ヤク、ネコ、ネズミ、イヌ、カタツムリなどのあらゆる組織（例えば、下垂体、脾臓、腎臓、肝臓、生精腺、甲状腺、胆のう、腎臓、副腎、皮膚、筋肉、肺、消化管、血管、心臓など）または細胞など）に由来するα蛋白質配型型レゾータ<sup>(1)</sup>であるであって、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列と、同一または実質的に同一のアミノ酸配列を含有するものとあれば何なるものであってもよい。すなわち、本明記のα蛋白質配型型レゾータ・蛋白質としては、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列を含有するα蛋白質と；2で表わされるアミノ酸配列を含有するα蛋白質との他に、配列番号：1で表わされるアミノ酸配列とは90～99.9%の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、配列番号：1を含有するα蛋白質と実質的に同様の活性を有するα蛋白質、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列と約90～99.9%の相同性を有するアミノ

40

ノ機配列を告げし、配列番号 1, 2 を含有する蛋白質と実質的に同質の活性を有する蛋白質とが挙げられる。実質的に同質の活性としては、例えはリガンド結合活性、シグナル情報伝達活性とが挙げられる。実質的に同質とは、リガンド結合活性などが生体機能に同質であることを示す。したがって、リガンド結合活性の強さなどの強弱、レセプター蛋白質の分子量などの別の要素は異なっている。

【0019】より具体的に、本発明のG蛋白質共役型  
レセプター蛋白質としては、配列番号：1で表わされる  
アミノ酸配列を含有するト膜由来のG蛋白質共役型  
セブダニ蛋白質などを挙げられる。また、本発明のG蛋  
白質共役型レセプター蛋白質としては、配列番号：1で  
表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ  
酸（好ましくは、1個以上3.0個以下、さらに好ましくは  
1個以上2.0個以下、より好ましくは、1個以上1.0個以  
下）が生成したアミノ酸配列（配列番号：1

下のアミノ酸)が欠けた(アミノ酸配列に下のアミノ酸の残基がない)状態は、2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸)が付いたアミノ酸配列(配列番号：1で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個以下、さらに好ましくは1個以上20個以下、より好ましくは1個以上10個以下のアミノ酸)が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸含有する蛋白質とよく挙げられる。また、本発明のG蛋白質共役型シグナル-蛋白質としては、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列を含有すると特由由来のG蛋白質共役型シグナル-蛋白質がよく挙げられる。

G蛋白質共役型シグナル-蛋白質として、また、本発明のG蛋白質共役型シグナル-蛋白質の中または、配列番号：2で表わされるアミノ酸配列中の1または2個以上のアミノ酸(好ましくは1個以上30個以下

るいは糖鎖が結合したいわゆる糖蛋白質などの場合蛋白質とも含まれる。さらにまた、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質には、本発明の配列番号1あるいは別の配列番号:2の3'ノド配列と同一または実質的に同一の1/3ノド配列あるいはプロセッシングを含有するDNAをクエンチあるいはフローティングとして用いてクロニングされたDNAによりコードされ、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩あるいは誘導蛋白質共役型レセプター蛋白質の塩をコードするものが好ましい。

しても理解できる。さらに具体的にたは本邦での配列番号 3 あるいは配列番号 4 の DNA 由来あるいはその部分配列またはその情報に基づいた DNA をブライマーあるいはプロンプとして用いてクローニングされた DNA によりコーディングされた C 蛋白質共役型シグナル蛋白質 A またはその塩あるいは該 C 蛋白質共役型シグナル蛋白質またはその塩またはその塩であつてよいことも理解されよう。

**【0020】** 本発明のG蛋白質共役型シセター-蛋白質は、  
の塩としては、とりわけ生理学的に許容される数の陽イオン  
が好ましい。この様な塩としては、例えば無機酸（例え  
ば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸）との塩、あるいは有機酸（例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、フマル酸、マレイン酸、コハク酸、酒石酸、クエン酸、グルタミン酸、酪酸、安息香酸、メタンスルホン酸、ベンゼン磺酸）との塩などを用いられる。本発明のG蛋白質共役型シセター-蛋白質またはその塩は、温血動物の組織または細胞から自体公知の蛋白質の精製方法によって得ることもできるし、後述するG蛋白質共役型シセター-蛋白質を含むDNAを含むような形態の液体培養液によって調製することもできる。また、増殖することによっても調製することもできる。  
後述のペプチド合成法に準じて製造することもできる。  
本発明のG蛋白質共役型シセター-蛋白質の部分ペプ

ドとしては、例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質分の一又は、細胞膜の外に露出している部位一蛋白が用いられる。具体的には、(図2)あるいは(図4)で示される本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の疎水性ドメイン部分において細胞外領域(疎水性親水性親脂性)部位)であると分析された部分を含有ペプチドである。また、疎水性(hydrophobic)部位(ドメインを細胞内に含むペプチドも用い得るが、後述のドメインを同時に含む部分のペプチドも良い)。本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドとしての、とりわけ生理的に許容される酸付加量(アミノ酸残基)の塩、あるいは、例えば無機酸(例えば、塩酸、リン酸、臭化水素酸、硫酸)との塩、あるいは、有機酸(例えば、酢酸、辛酸、プロピオン酸、ブチル酸、ペンチン酸、ヘキサノ酸、オクタノ酸、デカノール酸、ドデカン酸、ステアロイル酸、安息香酸、メタンソルホン酸、ベンゼンソルホン酸)との塩が用いられる。

【0021】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩は、自体公知のペプチドの合成法に従って、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を適当なペプチダーゼで切断することによって製造することができる。さらに、該部分ペプチドをコードするDNAを含有する形質転換体を増殖することによっても製造することができる。ペプチドの合成法としては、例えば固相合成法、液相合成法のいずれによっても良い。すなわち、本発明の蛋白質を構成し得る部分ペプチドもしくはアミノ酸と残基部分とを結合させ、生物物が保護基を有する場合は保護基を脱離することにより目的のペプチドを製造することができる。公知の縮合方法や保護基の脱離としてはたとえば、以下の①～⑤に記載された方法が挙げられる。

- ①M. BodanszkyおよびM.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis)、Interscience Publisher s, New York (1966年)
- ②Schroeder およびLuibke、ザ・ペプチド(The Peptide)、Academic Press, N York (1965年)
- ③泉原啓夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)(1975年)

④矢島昭明および神原俊平、生化学実験講座 1、タンパク質の化学IV、205、(1977年)

⑤矢島昭明監修、経路薬品の開発第1巻ペプチド合成、川島店

また、反応後は通常の精製法、たとえば、塩析・溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・電気泳動法・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質を精製し得ることができ。上記方法で得られる蛋白質が選別体である場合は、公知の方法によって適当な塩に変換することができ、逆に塩で得られた場合は、公知の方法によって選別体に変換することができ。

【0022】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、本発明の配列番号：1のAミノ/酸配列と同一または実質的に同一のAミノ/酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するもの、あるいは配列番号：2のAミノ/酸配列と同一または実質的に同一のAミノ/酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するものであってもよい。また、ヒトβ<sub>2</sub>ADNA、ヒトβ<sub>2</sub>ADNAラ イブラリー、ヒト組換え細胞由来のcDNA、ヒト組換え細胞由来のcDNAライブラリー、合成DNAのいずれでもよい。ライブラリーに使用する場合DNAはバクテリオファージ、プラスミド、コスミド、ファージミドなどいづれであってもよい。また、組換え細胞よりmRNA断片を調製したのを用いて直接 Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (以下、RT-PCR法と略称する。)によって増殖することもできる。より

具体的には、配列番号：1のAミノ/酸配列を含有するヒト細胞由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNA、配列番号：2のAミノ/酸配列を含有するヒト肺由来のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAとしては、配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAなどが用いられる。さらには、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA Aとしては、本発明の配列番号：1あるいは配列番号：2のAミノ/酸配列と同一または実質的に同一のAミノ/酸配列を含有するG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を含有するDNAをプライマーあるいはプロンプとして用いてクロニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAでよいことと理解されよう。さらに具体的に本発明の配列番号：3あるいは配列番号：4のDNA自体あるいはその部分配列またはその情報に基づいたDNAをプライマーあるいはプロンプとして用いてクロニングされたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードする塩基配列を有するDNAであってよいことも理解されよう。

【0023】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を完全にコードするDNAのクロニングの手段としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分塩基配列を有する合成DNAプライマーを用いてPCR法によって増殖するか、または適当なベクターに組み込んだDNAをヒトG蛋白質共役型レセプター蛋白質の一部あるいは全領域を有するDNA断片もしくは合成DNAを用いて増殖したもののハybridライゼーションによって選別する。ハybridライゼーションの方法は、例えば Molec ular Cloning 2nd (ed. : J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989) に記載の方法などに従って行われる。また、市販のライブラリーを使用する場合、添付の使用説明書に記載の方法に従って行う。このPCR増幅方法は、公知のPCR法に従って実施することができ。例えば、Saiki R. K. et al. Science 239:487-491(1988)に記載の方法に従って実施することができる。PCR法の温度、時間、バッファ、サイクル数、DNAポリメラーゼなどの酵素、2'-deoxy-7-deaza -guanosine triphosphate やinosineの添加などは対象DNAの種類などに応じて適宜選択することができる。またRNAを鋳型として用いる場合は、Saiki R. K. et al. Science 239:487-491(1988)に記載の方法などに従って行なう。クロン化されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化したり、リンカーを付加したりして使用することができる。該DNAはその5'末端側に細菌開始コドンとしてのATGを有し、またまたはTACを有している。これらの開始開始コ

ドンや開始終止コドンは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することもできる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質の発現ベクターは、例えば、(イ)本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAから目的とするDNA断片を切り出し、(ロ)該DNA断片を適当な発現ベクター中のプロモーターの下流に連結することにより製造することができる。ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例、pBR322、pBR325、pUC12、pUC13など)、枯草菌由来のプラスミド(例、pUB110、pTP5、pC194など)、酵母由来プラスミド(例、pSH19、pSH15など)、λファージなどのバクテリオファージ、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、バクテロウイルスなどの動物ウイルスなどが用いられる。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に對して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。

【0024】形質転換する際の宿主がエシェリヒア属である場合は、trp プロモーター、lac プロモーター、rec Aプロモーター、λPLIプロモーター、lpp プロモーターなどが、宿主がバチルス属である場合は、SP O11プロモーター、SPO2プロモーター、pen Pプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオニンプロモーター、ヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどがそれぞれ利用できる。なお、発現にエンハンスナーの利用も効果的である。また、必要に応じて、宿主に合ったシグナル配列を、G蛋白質共役型レセプター蛋白質のN端末側に付加する。宿主がエシェリヒア属である場合は、アルカリフォスファターゼ・シグナル配列、OmpA・シグナル配列などが、宿主がバチルス属である場合は、α-アミラーゼ・シグナル配列、サブチリン・シグナル配列などが、宿主が酵母である場合は、メイテグファクタ-α・シグナル配列、インペルターゼ・シグナル配列など、宿主が動物細胞である場合には、例えばインシュリン・シグナル配列、α-インテグロフェリン・シグナル配列、抗体分子・シグナル配列などがそれぞれ利用できる。このようにして増殖されたG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。

【0025】宿主としては、たとえばエシェリヒア属、バチルス属、酵母、昆虫、動物細胞などが用いられる。エシェリヒア属、バチルス属の具体例としては、エシェリヒア・コリ(Escherichia coli) K12、DH1 (プロセージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユース

ー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、60巻、160(1968)、J.M103 (ヌクレック・アシックス・リサーチ、(Nucleic Acids Research)、9巻、309(1981)、J.A221 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology)、120巻、517(1978)、HB101 (ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー、459(1969)、C600 (ジェネティクス (Genetics)、39巻、440(1954))などが用いられる。バチルス属としては、たとえばバチルス・サチルス(Bacillus subtilis) M114 (ジョン・24巻、255(1983)、207-21 (ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (Journal of Biochemistry)、95巻、87(1984))などが用いられる。

【0026】酵母としては、たとえばサッカロミセスセレビシエ(Saccharomyces cerevisiae) AH22、AH22R、NA87-11A、DKD-5D、20B-12などが用いられる。昆虫としては、例えばカイロの幼虫などが用いられる(前田、ネイチャー (Nature)、315巻、592(1985))。動物細胞としては、たとえばサル細胞CHO、DHR遺伝子欠損チャイニーズハムスター細胞CHO (dhfr CHO細胞)、マウスL細胞、マウスミエローム細胞、ヒトFL細胞などが用いられる。エシェリヒア属を形質転換するには、たとえばプロセージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、69巻、2110(1972)やジーン (Gene)、17巻、107(1982)などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics)、168巻、111(1979)などに記載の方法に従って行われる。酵母を形質転換するには、たとえばプロセージングズ・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユースエー(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.)、75巻、1929(1978)に記載の方法に従って行なわれる。

【0027】昆虫細胞を形質転換するには、たとえばバイオテクノロジー (BioTechnology)、6、47-55(1988)などに記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばヴィロロジー (Virology)、52巻、456(1973)に記載の方法に従って行なわれる。このようにして、G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。宿主がエシェリヒア属、バチルス属である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であ





該細胞または該膜画分に對する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

④標識した試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接合させた場合における、標識した試験化合物などのG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対する結合量を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法。

【0035】⑤試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞に接合させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介した細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法、および

⑥試験化合物などを、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を培養することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接合させた場合における、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を測定することを特徴とするG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドの決定方法を提供する。

【0036】本発明のリガンド決定方法の具体的な説明を以下にする。まず、リガンド決定方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質または本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものであれば何れのもであつてもよいが、動物細胞を用いて大量発現させたG蛋白質共役型レセプター蛋白質が適している。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制限されるものではない。例えば、遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主動物細胞に導入し、それらを効率よく発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルスに属する核多角体病ウイルス(nuclea

r polyhedrosis virus: NPV) のポリヘドリンプロモーター、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタチオネインプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査は、それ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献(Kambli, P., 5, ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(J. Biol. Chem.), 267巻, 19555~19559頁, 1992年)に記載の方法に従って行うことができる。

【0037】したがって、本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含有するものとしては、それ自体公知の方法に従って精製したG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであつてもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよく、また該蛋白質を含有する細胞の膜画分を用いてもよい。本発明のリガンド決定方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタリルピロド、ホルマリンなどで固定してもよい。固定化方法として、それ自体公知の方法又はそれと類似の方法に従って行うことができる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞を用いるが、該宿主細胞としては、大腸菌、枯草菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜画分としては、細胞を破壊した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多く含まれる画分のことをいう。細胞の破壊方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンドーやポリトロン(Kinematica社製)による破壊、超音波による破壊、フレンチプレスなどに加圧しながら細胞を細いノズルから噴出させることによる破壊などが挙げられる。細胞膜の画分には、分画遠心分離法や密度勾配遠心分離法などの遠心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞破壊液を低速(500rpm~300rpm)で短時間(通常、約1分~10分)遠心し、上清をさらに高速(15000rpm~30000rpm)で通常30分~2時間遠心し、得られる沈液を膜画分とする。該膜画分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの膜成分が多く含まれる。

【0038】該G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜画分中のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>3</sup>~10<sup>4</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜画分当たりのリガンド結合活性(比活性)が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料

を測定できるようにする。G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①~⑥の方法を実施するために、適当なG蛋白質共役型レセプター画分と、標識した試験化合物が必要である。G蛋白質共役型レセプター画分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター画分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター画分が望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性などを示す。標識した試験化合物としては、(P H)、(H<sup>3</sup> I)、(H<sup>3</sup> C)、(S S)などで標識したアンギオテンシン、モンベシン、ボンベンシン、カナベノイド、コレシトキニン、グルタミン、セロトニン、メラトニン、ニューロペプチドY、オセオイド、プリン、パノプレンジン、オキシトシン、VIP (バソアクティブインテスティナル アン ド リレイテッド ペプチド)、ソマトスタチン、DRP (カルシウムニグジュン)レターディックペプチド)、アドレノメジュリン、ロイコトリエン、バンクレアスタチン、プロスタグランジン、トロンボサン、アデノシン、アドレナリン、αおよびβ-cheekone (1 L-8, GROα, GROβ, GROγ, GROγ, NA P-2, ENA-78, PFA, IP10, GCP-2, MCP-1, HC14, MCP-3, I-309, MIP1α, MIP-1β, RANTESなど)、エンドレリン、エンテロガストリン、ヒスタミン、ニューロテンシン、TRH、バンクレグチックポリペプチド、ガラニン、それらの類似体などが好適である。

【0039】具体的に、G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドの決定方法を行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞または細胞の膜画分を、決定方法に適したバッファーに懸濁することによりレセプター標品を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8)のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80<sup>®</sup> (花王-アトラス社)、ジギトニン、デオキシコレートなどの界面活性剤やウシ血清アルブミンやゼラチンなどの各種蛋白質をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPM S F、ロイペプチン、E-64 (ペプター研究所製)、ベプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することもできる。0.01ml~1.0mlの該レセプター溶液に、一定量(5000cpm~50000cpm)の(H<sup>3</sup> H)、(H<sup>3</sup> I)、(H<sup>3</sup> C)、(S S)などで標識した試験化合物を加えて混合させる。非特異的結合量(N S B)を知るために大過剰の未標識の試験化合物を加えた反応チューブも用意する。反応は0℃から50℃、望ましくは4℃から37℃で20分から24時間、

望ましくは30分から3時間行う。反応後、ガラス繊維濾紙等で濾過し、適量の同バッファーで洗浄した後、ガラス繊維濾紙に吸着する放射活性を液体シンチレーションカウンターのγ-カウンターで計測する。全結合(B)から非特異的結合(N S B)を引いたカウント(B-N S B)が0cpmを超え、試験化合物などを本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンドとして選択することができる。

【0040】G蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンドを決定する前記の①~⑥の方法を実施するためには、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸遊離、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または市販の測定用キットを用いて測定することができる。具体的には、まず、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞をマルチウェルプレート等に培養する。リガンド決定を行なうにあたっては、前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバッファーに交換し、試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した産物をそれぞれの方法に従って定量する。細胞刺激活性の指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成が、細胞が含有する分解酵素によって決定困難な場合は、該分解酵素に対する阻害剤を添加してアッセイを行なつてもよい。また、cAMP産生抑制などの活性については、フォスホリルセルなど細胞の基礎的産生量を増大させておいた細胞に対する産生抑制剤を用いて検出することができる。

【0041】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に結合するリガンド決定用キットは、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドまたはその塩、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞の膜画分を含有するものである。本発明のリガンド決定用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. リガンド決定用試薬

①測定用緩衝液および洗浄用緩衝液

Blank's Balanced Salt Solution (ギブコ社製)に、0.05%のウシ血清アルブミン(シグマ社製)を加えたもの。孔径0.45μmのフィルターで滅菌減菌し、4℃で保存するか、あるいは用時調製してもよい。

②G蛋白質共役型レセプター蛋白質標品

G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現させたCHO細胞を、12穴プレートに5×10<sup>5</sup>個/穴で播代し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 95%airで2日間培養したものを、



活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することと特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法、および

⑨本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化させる化合物 (例えば、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質に対するリガンド)を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を増殖することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合と、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質を活性化させる化合物および試験化合物を本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNAを含有する形質転換体を増殖することによって細胞膜上に発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質に接触させた場合における、G蛋白質共役型レセプターを介する細胞刺激活性 (例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>遊離、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトールリン酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質のリン酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など)を測定し、比較することと特徴とするリガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質との結合を阻害する化合物またはその塩のスクリーニング方法を提供す。

【0051】本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質が得られる以前は、G蛋白質共役型レセプターアゴニストまたはアンタゴニストをスクリーニングする場合、まずラットなどのG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞、組織またはその細胞膜面を用いて候補化合物を得て (一次スクリーニング)、その後に修飾補正化合物が実際にヒトのG蛋白質共役型レセプター蛋白質とリガンドとの結合を阻害するか否かを確認する試験 (二次スクリーニング)が必要であった。細胞、組織または細胞膜面分をそのまま用いられれば他のレセプター蛋白質も混在するために、目的とするレセプター蛋白質に対するアゴニストまたはアンタゴニストを実験にスクリーニングすることは困難であった。しかしながら、本発明のヒト由来G蛋白質共役型レセプター蛋白質を用いることによ

て、一次スクリーニングの必要がなくなり、リガンドとG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物を効率良くスクリーニングすることができる。さらに、スクリーニングされた化合物がG蛋白質共役型レセプターアゴニストかG蛋白質共役型レセプターアンタゴニストかを評価することができる。本発明のスクリーニング方法の具体的な説明を以下にする。まず、本発明のスクリーニング方法に用いるG蛋白質共役型レセプター蛋白質

としては、本発明のG蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含むものであれば何れのものであってもよいが、温血動物の脳の膜面が好適である。しかし、特にヒト由来の臓器の入手が極めて困難なことから、スクリーニングに用いられるものとしては、組織体をを用いて大規模にG蛋白質共役型レセプター蛋白質が選別して

【0052】G蛋白質共役型レセプター蛋白質を製造するには、前述の方法が用いられるが、該蛋白質をコードするDNAを哺乳動物細胞や昆虫細胞で発現することにより行うことができる。目的部分をコードするDNA断片には相補DNAが用いられるが、必ずしもこれに制約されるものではない。例えば遺伝子断片や合成DNAを用いてもよい。G蛋白質共役型レセプター蛋白質をコードするDNA断片を宿主細胞細胞に導入し、それらを効率的に発現させるためには、該DNA断片を昆虫を宿主とするバキュロウイルス (nuclear polyhedrosis virus: NPV) のポリヘドリウイルス、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネイブプロモーター、ヒトヒートショックプロモーター、サイトメガロウイルスプロモーター、SRαプロモーターなどの下流に組み込むのが好ましい。発現したレセプターの量と質の検査はそれ自体公知の方法で行うことができる。例えば、文献 (Hambl, P.ら、Z. ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (J. Biol. Chem.)、267巻、1995頁19559頁、1992年)に記載の方法に従って行うことができる。したがって、本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質またはG蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドを含むG蛋白質共役型レセプター蛋白質または該G蛋白質共役型レセプター蛋白質の部分ペプチドであってもよいし、該蛋白質を含有する細胞を用いてもよい。また該蛋白質を含有する細胞の膜面を用いてもよい。

【0053】本発明のスクリーニング方法において、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞を用いる場合、該細胞をグルタリルアルデヒド、ホルマリンなどで固定してもよい。固定化方法はそれ自体公知の方法又はそれと実質的に類似の改変法に従って行うことができ、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞としては、G蛋白質共役型レセプター蛋白質を発現した宿主細胞、昆虫細胞、動物細胞などが挙げられる。膜面分としては、細胞を溶解した後、それ自体公知の方法で得られる細胞膜が多量に含まれる画分のことをい。細胞の破砕方法としては、Potter-Elvehjem型ホモジナイザーで細胞を押し潰す方法、ワーリングブレンダーやポリトロン (Kinematic社製) による破砕、超音波による破

砕、フレンチプレスなどで加圧しながら細胞を叩いノズルから噴出させることによる破砕などが挙げられる。細胞膜の面には、分画過心分離法や密度勾配過心分離法などの過心力による分画法が主として用いられる。例えば、細胞膜溶液を低速 (500rpm~3000rpm) で短時間 (通常、約1分~10分) 過心し、上清をさらに高速 (15000rpm~30000rpm) で通常30分~2時間過心し、得られる沈澱を膜面分とする。該膜面分中には、発現したG蛋白質共役型レセプター蛋白質と細胞由来のリン脂質や膜蛋白質などの成分が多く含まれる。G蛋白質共役型レセプター蛋白質を含有する細胞や膜面分のG蛋白質共役型レセプター蛋白質の量は、1細胞当たり10<sup>3</sup>~10<sup>6</sup>分子であるのが好ましく、10<sup>5</sup>~10<sup>7</sup>分子であるのが好適である。なお、発現量が多いほど膜面分当りのリガンド結合活性 (比活性) が高くなり、高感度なスクリーニング系の構築が可能になるばかりでなく、同一ロットで大量の試料を測定できるようなる。

【0054】リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合を阻害する化合物をスクリーニングする前に、①~⑨を実施するためには、適当なG蛋白質共役型レセプター一面分と、標識したリガンドが必要である。G蛋白質共役型レセプター一面分としては、天然型のG蛋白質共役型レセプター一面分が、またはそれと同等の活性を有する組換え型G蛋白質共役型レセプター一面分が望ましい。ここで、同等の活性とは、同等のリガンド結合活性を示す。標識したリガンドとしては、標識したリガンド、標識したリガンドアログ化合物などが用いられる。例えば (P H)、(α<sup>3</sup> I)、(α<sup>3</sup> C)、(α<sup>3</sup> S) などで標識されたリガンドなどを利用することができ、具体的には、リガンドとG蛋白質共役型レセプター一面蛋白質との結合を阻害する化合物のスクリーニングを行うには、まずG蛋白質共役型レセプター蛋白質を含む細胞または細胞の膜面分を、スクリーニングに適したバッファーに懸濁することによりレセプター膜面を調製する。バッファーには、pH4~10 (望ましくはpH6~8) のリン酸バッファー、トリス-塩酸バッファーなどのリガンドXとレセプターとの結合を阻害しないバッファーであればいずれでもよい。また、非特異的結合を低減させる目的で、CHAPS、Tween-80 (花王-アトラス社)、ジギニン、デオキシコラーなどの界面活性剤をバッファーに加えることもできる。さらに、プロテアーゼによるレセプターやリガンドの分解を抑える目的でPMSF、ロイペプチン、E-64 (バブチド研究所製)、ペプスタチンなどのプロテアーゼ阻害剤を添加することでもできる。0.01ml~10mlの該レセプター溶液に、一定量 (5000cpm~50000cpm) の標識したリガンドを添加し、同時に10<sup>-4</sup>M~10<sup>-10</sup>Mの試験化合物を共存させる。非特異的結合量 (NSB) を知るために大過剰の未標識

のりカンデを加えた反応チューブを用いる。反応は0でから5.0℃、望ましくは4℃でから3.7で2.0分から2.4時間、望ましくは3.0分から3.7時間行う。反応後、カンデと繊維紙等で濾過し、適量の同いブザーで洗浄した後、カンデと繊維紙に現存する成分を溶媒溶液で抽出し、ヨウカンソナまたはγ-カンダーで計測する。捨てる物質がない場合のカンセント(B<sub>0</sub>)から非特異的結合量(NSB)を引いたカンセント(B<sub>0</sub>-NSB)が10.0%以下した時、特異的結合量(B-NSB)が割れば10.0%以下になる試験化合物を括弧但能力のある候補物として選択することができ。

セプター-蛋白質の部分ベータドまたはその塩、本発明のセプター蛋白質とセプター-蛋白質を含有する細胞、あるいは本発明のセプター蛋白質とセプター-蛋白質を含有する細胞の膜成分を含有するものとして、本発明のスクリーニング用キットの例としては、次のものが挙げられる。

1. スクリーニング用試薬  
測定用緩衝液および洗浄用緩衝液  
Hanks' Balanced Salt Solution (ギブコ社製) に、  
0. 05 % のウシ血清アルブミン (シグマ社製) を加えたもの。孔径 0. 45  $\mu$ m のフィルターで滅菌過濾し、

【0055】リガンドと本発明のG蛋白質共役型セブター-蛋白質との結合を阻害する化合物スクリーニングする前記①～⑤の方法を実施するためには、G蛋白質は、役割型セブター-蛋白質を介する細胞刺激活性（例えば、アラキドン酸遊離、アセチルコリン遊離、細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度、細胞内cAMP生成、細胞内cGMP生成、イノシトール

4℃で保存するか、あるいは用時調製して使う。

②C蛋白質収型シセター-標品

C蛋白質収型シセター-蛋白質を収現させたCHO細胞を、 $1.2 \times 10^5$ 個/穴で継代し、37℃、5%CO<sub>2</sub>、9.5%a1rで2日間培養したものを。

トールリソ酸産生、細胞膜電位変動、細胞内蛋白質の酸化、c-fosの活性化、pHの低下などを促進する活性または抑制する活性など）を公知の方法または販売の測定用キットを用いて測定することができる。具

③乾燥リガンド  
市販の  $(^3\text{H})$ 、 $(^{13}\text{C})$ 、 $(^{35}\text{S})$  などで標識したリガンド  
水溶液の状態のものを4℃あるいは-20℃にて保存し、用時に測定用緩衝液にて1  $\mu\text{M}$  に希釈する。

的)には、まず、ヒ重口貝科や聖ヒレノミ科の細胞をマルチウエルブシート等に培養する。スクーピングを行なうにあたっては前もって新鮮な培地あるいは細胞に毒性を示さない適当なバクテリアに交換し

④リガンド標準液  
リガンドを0.1%水溶液アルブミン(シグマ社製)を含むPBSで1mMのように溶解し、-20℃に保存する。

試験化合物などを添加して一定時間インキュベートした後、細胞を抽出あるいは上清液を回収して、生成した物をそれぞれの方法に従って定置する。細胞刺激活性指標とする物質（例えば、アラキドン酸など）の生成

【0057】2. 測定法  
①12穴組織培養用プレートにて培養したC蛋白質共  
型シセター蛋白質を発現させたCHO細胞を、測定  
緩衝液1mlにて2回洗浄した後、490μlの測定用

は、該分解酵素に対する阻害剤を添加して「アッセイ」  
 になってもよい。また、cAMP産生抑制などの活性に  
 いては、フオルスコンなど細胞の基礎的産生量を出  
 大させておいた細胞に対する産生抑制作用として検出

②  $10^{-3} \sim 10^{-10}$  M の試験化合物溶液を  $5 \mu\text{l}$  に加え、標識リガンドを  $5 \mu\text{l}$  に加え、室温にて 1 時間反応させる。非特異的結合量を知るためには試験化合物の

ることができる。細胞刺激活性を測定してスクリーニングを行なうには、適当なG蛋白質共役型レプタゲン質を発現した細胞が必要である。本発明のG蛋白質共役型レプタゲン蛋白質を発現した細胞としては、天然型

③反応液を除去し、1 ml の洗浄用緩衝液で3回洗浄する。細胞に結合した標識リガンドを0.2N NaOH-1% SDS で溶解し、4 ml の液体ソニチエーター（和光純薬製）と混合する。

本発明のヒゲ蛋白共役型シセナター蛋白質株、前述の組換え型ヒゲ蛋白共役型シセナター蛋白質株、例えば、CHO細胞、COS細胞など）を、現細胞株（例えば、CHO細胞、COS細胞など）が望ましい。試験化合物としては、例えばベナチド、ソバチ、非ベナチド性化合物、合成化合物、発酵生産

④液体シンチレーションカウンター（ベックマン社製）を用いて放射活性を測定し、Percent Maximum Binding (PMB) を次の式（数1）で求める。

【0058】

物、細胞抽出液、植物抽出液、動物組織抽出液、血清、血液、体液などが挙げられ、これら化合物は新規な化合物であってもよいし、公知の化合物であってもよい。【0056】リガンドと本発明のC蛋白質共役型シ

【数1】  $PMB = ((B - NSB)) / (B_0 - NSB)) \times 100$   
PMB: Percent Maximum Binding  
B: 換体を加えた時の値

ター蛋白質との結合を開閉する化合物またはその塩  
クリニソブ用キットは、本発明のG蛋白質共役型  
プター蛋白質またはその塩、本発明のG蛋白質共役

N S B : NON-SPECIAL DURING (NT 1994-2000) 50

ニーゾウギキットを用いて得られる化合物またはその塩  
 は、リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの  
 結合性を低下させる化合物またはその塩である。特に好  
 ましくは本発明のヌクレオニッド方法は、スクリーニ  
 ッグ用キットを用いて得られる化合物またはその塩は、  
 リガンドと本発明のG蛋白質共役型レセプターとの結合  
 を促進する化合物であり、具体的にそのG蛋白質共役型  
 セレプターを介して細胞増殖活性を有する化合物または  
 その塩（いわゆる「G蛋白質共役型レセプター・グアニニ  
 ト」）、あるいは該細胞増殖性を有しない化合物（いわゆ  
 る「G蛋白質共役型レセプター・グアニニト」）であ  
 る。該化合物としては、ペプチド、タンパク、非ペプ  
 ト性化合物、合成化合物、発酵生産物など挙げられ、  
 これら化合物は新規な化合物であってもよい、公知の  
 化合物であってもよい。該G蛋白質共役型レセプター・  
 グアニニトは、本発明のG蛋白質共役型レセプター・  
 グアニニトに対するリガンドが有する生理活性と同等の活性を有し  
 ているので、該リガンド活性に応じて安全で効果的な薬  
 薬組成物として有用である。逆に、G蛋白質共役型レ  
 セプター・グアニニト・グアニニトは、本発明のG蛋白質共役型レ  
 セプター・グアニニトに対するリガンドが有する生理活性を抑制  
 することができるので、該リガンド活性を抑制する安全  
 で効果的な薬組成物として有用である。例えば、本発  
 明のG蛋白質共役型レセプター・グアニニトに対するリガン  
 ンであるペプチド、タンパク、非ペプチド、合成化合物、  
 発酵生産物などを用いて得られる化合物またはその塩

て、また産業用製剤として使用できる。例えば、必要に応じて殺虫剤を簡した錠剤、カブセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などとして粒剤に、あるいは水もしくはそれ以外の薬液に、普普通通の液との無菌性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、酸化合物またはその塩を生理学的に認められる相対、香味料、顔料、ペレグリン、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用型形成で組み入れることによって製造することができ、これら製剤における有効成分量は指定された範囲の適当な容量が得られるように注意される。錠剤、カブセル剤などには溶解することができ、添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガカント、アラビアガムのような結合剤、結晶性セルロースのような置形剤、コーンスターチ、ゼラチン、ポリビニル酸などの置形化剤、ステアリン酸、ステアリン酸のような置形剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味料、ペーパミント、アモニウム油またはチエーリールである場合には、前記タイルの材料にさらに油脂のような成分を含有することができ、調剤車油またはカブセルの液体状成分は注射用水のようなペリクル中の活性性質、防腐剤、椰子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にたいてい処方することができである。

アブチニンは、ソブチニチンが有する生理活性の全部または一部を有しているので、酸生肌活性に応じて安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、成長ホルモン、下垂体ホルモン（例えば、ガストリン、イ

【0061】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばエタノール（エタノール）などを用いることができる。

ソジリオンなど)等のホルモンの産生抑制剤などとして有用であり、さらには内分泌疾患、内分泌腫瘍、ホルモン産生腫瘍、先端巨大症、巨人症、痲呆症、糖尿病、胃潰瘍などの予防または(および)治療剤などとして有用である。

はアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリエチレン（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50など）などを用いてもよい。油性液としてはアブラ油、大豆油などから

トは、ソラステアチンが有する生理活性の全部または一部を抑制することができるので、該生理活性を抑制する安全で低毒性な医薬組成物として有用である。例えば、成長ホルモン、下垂体ホルモン（例えば、甲状腺刺激ホ

げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、凝固剤（例えば、塩化ベンザルニウム、塩酸プロカ

ルモン、プロラクチンなど）、消性ホルモン（例えば、ガストリン、インシュリンなど）等のホルモンの産生抑制剤などとして有用であり、さらには小児症、高年者創傷、骨粗鬆症、不眠症、肝機能疾患、乳汁分泌不

ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、  
エチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジ  
アルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配  
してもよい。調整された注射液は通常、適当なアソ  
ブに充填される。このようにして得られる製剤は安全で

全、糖尿病などの予防または（および）治療剤、あるいは消化管諸臓器の機能調節剤（例えば、胃、小腸、肝臓、肝臓などの臓器の機能調節剤）などとして有用である。

毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ササギ、ヒツジ、ゾウ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。酸化合物はその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが

一ニング用キットを用いて得られる化合物またはその塩を上述の医薬組成物として使用する場合、常套手段に従って実施することができる。該組成物は様々な医薬製剤

程口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）に  
いては、一日につき約0.1～100 mg、好ましく  
約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20

て、また産業用製剤として使用できる。例えば、必要に応じて殺虫剤を簡した錠剤、カブセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤などにして経口的に、あるいは水もしくはそれ以外の薬液中に溶解し得る液との無毒性溶液、または懸濁液剤などの注射剤の形で非経口的に使用できる。例えば、酸化合物またはその塩を生理学的に認められる相対、香味料、顔料材料、ペレグリン、防腐剤、安定剤、結合剤などとともに一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で組み入れることによって製造することができ、これら製剤における有効成分量は指定された範囲の適当な容量が得られるように注意して調整する。錠剤、カブセル剤などに比較することのできる添加剤としては、例えばゼラチン、コーンスターチ、トラガカン、アラビアゴムのような結合剤、結晶性セルロースのような置換剤、コーンスターチ、ゼラチン、ポリビニルアルコールのような膨化剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖またはサッカリンのような甘味料、ベンゾイン、アカモド油またはフェニチーユのような香料などは、前記タイルの材料ならぬ油脂類のようなある場合には、前記タイルの材料ならぬ油脂類のような液体は注用用水のようなペリクル中の活性性質、腐敗成物は注用用水のようなペリクル中の活性性質、腐敗油、樟子油などのような天然産出植物油などを溶解または懸濁させるなどの通常の製剤実施にならうて処方することができる。

【0061】注射用の水性液としては、例えば、生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬を含む等張液（例えば、D-ソルビトール、D-マンニトール、塩化ナトリウムなど）などがあげられ、適当な溶解補助剤、たとえばエタノール（エタノール）などを用いることができる。

はアルコール（たとえばエタノールなど）、ポリエチレン（たとえばプロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど）、非イオン性界面活性剤（たとえばポリソルベート80（TM）、HCO-50など）などを用いてもよい。油性液としてはアブラ油、大豆油などから

げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジアルコールなどと併用してもよい。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液など）、凝固剤（例えば、塩化ベンザルニウム、塩酸プロカ

ンなど)、安定剤(例えば、ヒト血清アルブミン、  
エチレングリコールなど)、保存剤(例えば、ベンジ  
アルコール、フェノールなど)、酸化防止剤などと配  
してもよい。調整された注射液は通常、適当なアソ  
ブに充填される。このようにして得られる製剤は安全で

毒性であるので、例えば温血哺乳動物（例えば、ラット、ササギ、ヒツジ、ゾウ、ウシ、ネコ、イヌ、サル、ヒトなど）に対して投与することができる。酸化合物はその塩の投与量は、症状などにより差異はあるが

程口投与の場合、一般的に成人（60 kgとして）に  
いては、一日につき約0.1～100 mg、好ましく  
約1.0～50 mg、より好ましくは約1.0～20







った粗水性のものが挙げられる。付加するに好ましい脂質としては、コレステロールやその誘導体（例えば、コレステリルクロホルメート、コレステロール）が挙げられる。こうしたものは、核糖の3' 端あるいは5' 端に付加させることができ、塩基、糖、分子内ヌクレオチド結合を介して付加させることができる。その他の基としては、核糖の3' 端あるいは5' 端に特異的に配位されたキヤップ用の基で、エキソヌクレオザ、RNAaseなどのヌクレオザによる分解を阻止するためのもの挙げられる。こうしたキヤップ用の基としては、ポリチレングリコール、テトラエチレングリコールなどのグリコールをはじめとした当分野で知られた水溶性の保護基が挙げられるが、それに限定されるものではない。アンチセンス・オリゴヌクレオチドの阻害活性は、本発明の形質転換体、本発明の生体内や生体外の遺伝子発現系、あるいはC蛋白質共役型レセプター蛋白質の生体内や生体外の細胞系を用いて調べることもできる。核オリゴヌクレオチドがそれ自体公知の各種の方法で細胞に適用できる。

【0075】本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体がある場合は、特に明示しなければ示すものとする。

- 【0076】
- DNA
  - cDNA
  - A
  - T
  - G
  - RNA
  - mRNA
  - dATP
  - dTTP
  - dCTP
  - dGTP
  - ATP
  - EDTA
  - SDS
  - EIA
  - Gly
  - Ala
  - Val
  - Leu
  - Ile
  - Ser
- 【0077】
- デオキシリボ核酸
  - 相補的デオキシリボ核酸
  - アデニン
  - チミン
  - グアニン
  - シトシン
  - リボ核酸
  - メッセンジャーリボ核酸
  - デオキシアデノシン三リン酸
  - デオキシチミジン三リン酸
  - デオキシグアニン三リン酸
  - デオキシシトシン三リン酸
  - アデニン三リン酸
  - エチレンジアミン四酢酸
  - デニル硫酸ナトリウム
  - エンザイム/アッセイ
  - グリシン
  - アラニン
  - バリン
  - ロイシン
  - イソロイシン
  - セリン

ー (HUMOP1ODRE)、ウシ由来サブスタンスKレセプター (BTSKR)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-2 (HUMSR12A)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSTR3Y)、ヒト由来チンレセプター (HUMCAR)、ヒト由来コレステロニルレセプター (HUMCCR)、ヒト由来バミレセプター-D5 (HUMD1B)、ヒト由来セロトニンレセプター-5HT1E (HUM5HT1E)、ヒト由来バミレセプター-D4 (HUMD4C)、ウシ由来セロトニンレセプター-2 (MMS4C)、ラット由来α-1A-アドレナジックレセプター (RATADRA1A)、ラット由来ニグマミンHレセプター (S57565) などの第2膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。上記の( ) 内の略語はDMSIS Gene/Protein シークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウエアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、それぞれ通常 Accession Number およびエントリネームと呼ばれるものである。

【0079】さらに、公知のC蛋白質共役型レセプター、すなわちヒト由来セロトニンレセプター (HUMGALAREC)、ラット由来A1アドレナジックレセプター (RAT1ADREC)、ブタ由来アングイオテンジンレセプター (PIGA2R)、ラット由来セロトニンレセプター (S5HTTRTC)、ヒト由来バミレセプター (S58541)、ヒト由来ガスタリニンリシンングペプチドレセプター (HUMGRPR)、マウス由来GRP/ポンペニンレセプター (MUSGRPBO)、ラット由来バスキニュータイプ1アングイオテンジニンレセプター (RRVT1AIR)、ヒト由来ムスカリンセクアセチルコリンレセプター (HSHM4)、ヒト由来β-1アドレナジックレセプター (HUMDRB1)、ヒト由来ガスタリニンレセプター (HUMGARE)、ラット由来コレステロニルレセプター (RATCCR)、ラット由来リガンダ不明レセプター (S59748)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター (HUMSTR3Y)、ラット由来リガンダ不明レセプター (RNGPROCR)、マウス由来ソマトスタチンレセプター-1 (MUSSTR1A)、ヒト由来α-1アドレナジックレセプター (HUMA1AADR)、マウス由来セロトニンレセプター (S6618)、ヒト由来ソマトスタチンレセプター-3 (HUMSTR3Y) などの第7膜貫通領域付近のアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を比較し、類似性の高い部分を見いだした。上記の( ) 内の略語はDMSIS Gene/Protein シークエンスデータベース (CD019、日立ソフトウエアエンジニアリング) を用いて GenBank/EMBL Data Bank を検索した際に示される整理番号であり、それぞれ通常 Accession Number およびエントリネームと呼ばれるものである。

ームと呼ばれるものである。特に、多くのレセプター蛋白質をコードするcDNAで一致する塩基部分を基とし、その他の部分においてもなるべく多くのレセプターcDNAと配列の一致性を高めるために塩基配列に相補的である配列番号: 5 (T2A) または配列番号: 6 (T7A) で表わされる塩基配列を有する合成DNAを作成した。

【0080】配列番号: 5 (T2A プライマー) で表わされる塩基配列は、5'-GYCACCAACN: WTTTCATCCTSWN: HCTGC-3' (SはCまたはTを示し、YはCまたはTを示し、WはAまたはTを示し、HはA、CまたはTを示し、N<sub>2</sub> はIを示す。( ) 内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。ただし、Iはイノシンである。) である。

【0081】配列番号: 6 (T7A プライマー) で表わされる塩基配列は、5'-ASN<sub>2</sub> SAN: RAAC SARTAGAN: GAN: RCGRTT-3' (RはAまたはGを示し、SはCまたはTを示し、N<sub>2</sub> はIを示す。( ) 内は合成時に複数の塩基に混合して合成する。ただし、Iはイノシンである。) である。

【実施例1】ヒト由来cDNA・RNA画分からcDNAの合成

ヒト由来cDNA・RNAは、和光純薬株式会社から購入したpoly(A)・RNA画分5μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー (BR社) を加え、モノイマウス白血球ウイルスの逆転写酵素 (BR社) により、添付バッファーを用いて粗DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈降を行った後、30μlのTE (Tris-EDTA solution: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)) に溶解した。

【0083】

【実施例2】ヒト由来cDNAを用いたPCR法による受容体cDNAの増幅

実施例1でヒト由来より調製したcDNA 3μlを型として使用し、上記参考例で合成したT2A、T7AのDNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、核合成DNAプライマー各100pM、0.25mM dNTPs (Deoxyribonucleotide triphosphates)、Taq DNA polymerase (宝酒造) 1μlおよび酵素に付属の10×Taq buffer 10μlで、総反応液量は100μlとした。増幅のため1サイクルはサーマルサイクラー (パーキン・エルマー社) を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60℃・3分のサイクルを25回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、残りの反応液を混合し、95℃・5分の加熱を行った。増幅産物の確認は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロムリド染色によって行った。

【0084】PCR産物のアラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解析による新規シセター蛋白質候補クローンの選択

実施例2で行なったPCR後の反応産物は、2%のエチドブロム化シセター蛋白質を用いて分離し、バンドの部分をかみ取り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロジン社）の処方に従い、回収したDNAをアラスミドベクター-pCR<sup>Ⅱ</sup>（TMは登録商標を意味する）へサブクローニングした。これら大腸菌JM109 competent cell（宝通薬品会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアプレンジン、インゾルチオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）および5-ブ

シド（X-gal）を含むLB寒天培地（Mitsubishi Chemical）中で選択し、白色を呈するクローンのみを減菌したつま細枝を用いて分離し、形質転換体エシエリヒヤコリ（Escherichia coli）JM109/pPBBS002を得た。個々のクローンをアプレンジンを含むLB培地で一般培養し、自動アラスミド抽出装置（ク

ラボウ社）を用いてアラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてECORIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。現りのDNAの一部をさらにRNase E処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は、Dyebeary Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライド・バイオシステムズ社：ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。図1において下線で示した部分はPCRで用いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列（配列番号：3（図1の塩基配列））をもとにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシエリヒヤコリ（Escherichia coli）JM109/pPBBS002の保有するアラスミドに挿入されたcDNA断片が新規cDNA蛋白質共役型シセター蛋白質をコードすること

が分かった。それをさらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した（配列番号：2（図4のアミノ酸配列））。疎水性プロット（図5）およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ2（P30874）、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ3（P32745）との相同性を見いだした（図3）。上記の（ ）内の略号は、NCBI-PIR/Swiss-Prot にデータとして登録される際の整理番号であり、通常

Accession Numberまたはエントリ・ネームと呼ばれるものである。

【0085】ヒト肺由来 poly(A)・RNA画分からのcDNAの合成

ヒト肺由来 poly(A)・RNAは、クローニング社（Clontech Laboratories, USA）から購入した。購入した poly(A)・RNA画分5μgにプライマーとしてランダムDNAヘキサマー（BRL社）を加え、モロニイ・ワウス白血病ウイルスの逆転写酵素（BRL社）により、添付プライマーを用いて相補DNAを合成した。反応後の産物はエタノール沈殿を行った後、30μlのTE（Tris-EDTA solution: 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1mM EDTA (pH 8.0)）に溶解した。

【0086】

【実施例5】ヒト肺由来cDNAを用いたPCR法による変容体cDNAの増幅

実施例4でヒト肺由来より調製したcDNA3μlを御型として使用し、上記参考例で合成したT2A、T7AのDNAプライマーを用いてPCR法による増幅を行った。反応液の組成は、核合成DNAプライマー各100pM、0.25mM dNTPs（deoxyribonucleoside triphosphates）、Taq DNA polymerase（宝通薬品）1μlおよび酵素に付面の10×Taq buffer 10μlで、総反応液量は100μlとした。増幅のためのサイクルはサーマルサイクラー（パーキン・エルマー社）を用い、96℃・30秒、45℃・1分、60℃・3分のサイクルを25回繰り返した。Taq DNA polymerase を添加する前に、現りの反応液を混合し、95℃・5分、65℃・5分の加熱を行った。増幅産物の濃度は1.2%アガロースゲル電気泳動およびエチジウムブロミド染色によって行った。

【0087】

【実施例6】PCR産物のアラスミドベクターへのサブクローニングおよび挿入cDNA部分の塩基配列の解析による新規シセター蛋白質候補クローンの選択

実施例5で行なったPCR後の反応産物は、2%のエチドブロム化シセター蛋白質を用いて分離し、バンドの部分をかみ取り出した後、熱融解、フェノール抽出、エタノール沈殿を行ってDNAを回収した。TAクローニングキット（インビトロジン社）の処方に従い、回収したDNAをアラスミドベクター-pCR<sup>Ⅱ</sup>（TMは登録商標を意味する）へサブクローニングした。これら大腸菌JM109 competent cell（宝通薬品会社）に導入して形質転換したのち、cDNA挿入断片を持つクローンをアプレンジン、インゾルチオ-β-D-ガラクトシド（IPTG）および5-ブシド（X-gal）を含むLB寒天培地（Mitsubishi Chemical）中で選択し、白色を呈するクローンのみを減菌したつま細枝を用いて分離し、形質転換体エシエリヒヤコリ（Escherichia coli）JM109/pPLBS003の保有するアラスミドに挿入されたcDNA断片が新規cDNA蛋白質共役型シセター蛋白質をコードすること

が分かった。それをさらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した（配列番号：2（図4のアミノ酸配列））。疎水性プロット（図5）およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ2（P30874）、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ3（P32745）との相同性を見いだした（図3）。上記の（ ）内の略号は、NCBI-PIR/Swiss-Prot にデータとして登録される際の整理番号であり、通常

を減菌したつま細枝を用いて分離し、形質転換体エシエリヒヤコリ（Escherichia coli）JM109/pPLBS003を得た。個々のクローンをアプレンジンを含むLB培地で一般培養し、自動アラスミド抽出装置（ク

ラボウ社）を用いてアラスミドDNAを調製した。調製したDNAの一部を用いてECORIによる切断を行い、挿入されているcDNA断片の大きさを確認した。現りのDNAの一部をさらにRNase E処理、フェノール・クロロホルム抽出し、エタノール沈殿によって濃縮した。塩基配列の決定のための反応は、Dyebeary Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライド・バイオシステムズ社：ABI社）を用いて行い、蛍光式自動シーケンサーを用いて解読し、得られた塩基配列の解析はDNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用いて行った。図4において下線で示した部分はPCRで用いた合成プライマーに相当する部分である。決定した塩基配列（配列番号：4（図4の塩基配列））をもとにホモロジー検索を行なった結果、形質転換体エシエリヒヤコリ（Escherichia coli）JM109/pPLBS003の保有するアラスミドに挿入されたcDNA断片が新規cDNA蛋白質共役型シセター蛋白質をコードすること

が分かった。それをさらに確認するために、DNASIS（日立システムエンジニアリング社）を用い、塩基配列をアミノ酸配列に変換した（配列番号：2（図4のアミノ酸配列））。疎水性プロット（図5）およびアミノ酸配列に基づくホモロジー検索を行ない、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ2（P30874）、ヒトのソラスチンセター・サブタイプ3（P32745）との相同性を見いだした（図3）。上記の（ ）内の略号は、NCBI-PIR/Swiss-Prot にデータとして登録される際の整理番号であり、通常

Accession Numberまたはエントリ・ネームと呼ばれるものである。

【0088】本発明のcDNA蛋白質共役型シセター蛋白質およびcDNA蛋白質をコードするDNAは、①本発明の蛋白質共役型シセター蛋白質に対するリガンドの決定、②抗体および抗血清の入手、③相対型シセター蛋白質の発現系の構築、④同発現系を用いたシセター結合アッセイ系の開発と医薬品候補化合物のスクリーニング、⑤構造的に類似したリガンド・シセターとの比較をもとにしたドラッグデザインの実施、⑥遺伝子移断におけるアライメント、PCRプライマーの作成、⑦遺伝子治療等に用いることができる。特に、cDNA蛋白質共役型シセター-核酸の構造・性質の解明はこれらの系に作用するユニークな医薬品の開発につながる。

【0089】

【配列】

【配列番号：1】

配列の長さ：223

配列の型：アミノ酸

1ボロジン：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Ala Ile Ala Asp Glu Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Ile Asn Ile Ala

1 5 10 15

Asp Phe Leu Leu Arg Gln Trp Pro Phe Gly Cys Leu Met Cys Lys Leu

20 25 30

Ile Val Ala Ile Asp Gln Tyr Asn Thr Phe Ser Ser Leu Tyr Phe Leu

35 40 45

Thr Val Met Ser Ala Asp Arg Tyr Leu Val Val Leu Ala Thr Ala Glu

50 55 60

Ser Arg Arg Val Val Gly Arg Thr Tyr Ser Ala Ala Arg Ala Val Ser

65 70 75 80

Leu Ala Val Trp Gly Ile Val Thr Leu Val Val Leu Ser Phe Ala Val

85 90 95

Phe Ala Arg Leu Asp Asp Glu Gln Cys Arg Arg Gln Cys Val Leu Val

100 105 110

Phe Pro Gln Pro Gln Ala Phe Trp Trp Arg Ala Ser Arg Leu Tyr Thr

115 120 125

Leu Val Leu Gly Phe Ala Ile Pro Val Ser Thr Ile Cys Val Leu Tyr

130 135 140

Thr Thr Leu Leu Cys Arg Leu His Ala Met Gly Leu Asp Ser His Ala

145 150 155 160

Lys Ala Leu Glu Arg Ala Lys Arg Val Thr Phe Leu Val Val Ala

165 170 175



55

56

58

Ile Leu Ala Val Cys Leu Leu Cys Trp Thr Tyr His Leu Ser Thr  
Val Val Ala Leu Thr Asp Leu Pro Clin Thr Pro Leu Val Ile Ala  
Ile Ser Tyr Phe Ile Thr Ser Leu Ser Tyr Ala Asn Ser Cys Leu

180      185            190  
195          200         205  
210          215         220         223

106001

【配列番号: 2】

配列の長さ: 224

配列の型：アミノ酸  
ドポロジー：直鎖状  
配列の種類：ペプチド

152

Ala Val Ala Asp Gly Leu Phe Thr Leu Val Leu Pro Val Asn Ile Ala  
1 5 10 15  
Cys His Leu Leu Cys Tyr Trp Pro Phe Gly Cys Leu Leu Cys Lys Leu  
20 25 30  
Val Leu Ala Val Asp His Tyr Asn Ile Phe Ser Ile Tyr Phe Leu  
35 40 45  
Ala Val Met Ser Val Asp Arg Tyr Val Val Leu Ala Thr Val Arg  
50 55 60  
Ser Arg His Met Pro Trp Arg Thr Tyr Arg Cys Ala Lys Val Ala Ser

190913

【配列番号: 3】

配列の長さ: 669

配列の型: 核酸

- 鎖の数：二本鎖
- トポロジ：直鎖状
- 配列の種類：cDNA
- 特徴を決定した方法：S

1821

60 GCACATGCGCC AGCAGCATCTT CAGCGTGTGTC CTGCGGCAATCA ACATCGGCGCA CTTCGTGCTC  
120 GCGCAGCTGCG CTTTGCGGGA CTTCAATGTGC AAGCTATATGC TGGCATATGCA CAGATGACAC  
180 ACGTTTTCGA CTCTTACTT CTTACGCGTC ATGACGCGCC AGCGCTACTC GTGTGCTTTG  
240 CCACTGTGCGG AATCGGCGGCG GTGTGTGCGT CTGATGACCA CTGCGGCGCGC GCGCGTGAAC  
300 CTGCGCGTGT GGGGATGCTT CAGACTGCTG CTACTGCTTC TGGCATCTT CCGCGGGGCTA  
360 CACGACGACA AGCGCGCGCGC CAGCTGTGCTC CTACCTTTTC GCGACGCGCA GCGCTCTGTGG  
420 TGGCGGCGGCA CCGCGCTCTTA CAGCGCTGTC CTGGCGCTTC CATCGCGGCT CAGTGCACATC

57

480  
490  
500  
510  
520  
530  
540  
550  
560  
570  
580  
590  
600  
610  
620  
630  
640  
650  
660  
670  
680  
690  
700  
710  
720  
730  
740  
750  
760  
770  
780  
790  
800  
810  
820  
830  
840  
850  
860  
870  
880  
890  
900  
910  
920  
930  
940  
950  
960  
970  
980  
990

1992

【配列番号: 4】

配列の長さ: 672

配列の型: 核酸

鎖の数：二本鎖  
トポロジー：直鎖  
配列の種類：c1

125

60  
120  
180  
240  
300  
360  
420  
480  
540  
600  
660  
672

ACATGCTGGCCG ACGGAGCTCTT CACGGCTGTTA CTGGCGGGCTA ACATGCTGGCCA CCACTGCTCTG  
CAGTACTGCG CTGTGGCGGA GTTGTCTGTCC AAGCTGTGTGC TGGCGGTGTGA CCACTACAC  
ATTCTTCTCA CAGTACTACT CTGACGGCTG ATGACGGCTGC ACCGATACTCT GTTGTGCTCTG  
CCGACAGCTGA CTGCTGGGCA CATGCGGTGC CCGACCTACG GCGCGCGGCA GTTGTGCGAC  
CTGTGTGTCT GTGTGGGGCT GTTGTGGCT CTGTCTTTT CCGTGGGGCT  
TAGAGCAGAC ACGTGCAGCT CCGAGAGTCT GCGTAGTCT TCGCTGTGCT CAGCAGCTC  
CTCTTCACGC CACGGCTCTT CTACAGCTTG TCGTGTGGCT TCGTGTGGC CAGTGTGAC  
ATTCTGTGTC TTGTAACAGA GTTGTGTGCG ACGTGTGGG CGTGTGGGGT CGGCTGTGGA  
CGCAGGCTC TAGCGAAGCG CAGCGCGAAG GTACAGCTGC TCGTGTCTGT GTTGTGTGCC  
CTGTGTGCTGA TGTGTGAC GCGCTTGCAC CTGGGCTCTG TCGTGTGGCT CAGACCGGAC  
CTGCGCGGCA CGGACCTGCT CATGAGTCT TCGTAGTGA TACAGAGCT CAGCTAGGCC  
AAGTCTGTGCC TG

100931

【5：音器/收器】

配列の長さ: 27

配列の型: 核磁

【図3】pPBBS002にコードされた蛋白質cDNAの部分アミノ酸配列。2. AA) を、ヒトのソマトスタチンタイプ1 (P30872)、ヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイプ2 (P30872)、ヒトのソマトスタチンレセプター・サブタイプ1 (P30872) と比較した。一致しているアミノ酸配列は太字で示されている。

[0094]

【参考文献】

配列の長さ: 27

複合の形・核種

鎖の数・一本鎖

【図4】ヒト肺よりPCR法によって得られたcDNAクローンpP1-1の塩基配列を決定した。cDNA断片は、cDNAライブラリにコードされるアミノ酸配列を示す。この断片はPCR増幅に用いた合成プライマーと一致する。

配列の種類・他の核酸 合成DNA

配列の特徴: N, けしを三才

110

ASN-2

【参考文献】

1997, 1998, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023, 2024, 2025, 2026, 2027, 2028, 2029, 2030, 2031, 2032, 2033, 2034, 2035, 2036, 2037, 2038, 2039, 2040, 2041, 2042, 2043, 2044, 2045, 2046, 2047, 2048, 2049, 2050, 2051, 2052, 2053, 2054, 2055, 2056, 2057, 2058, 2059, 2060, 2061, 2062, 2063, 2064, 2065, 2066, 2067, 2068, 2069, 2070, 2071, 2072, 2073, 2074, 2075, 2076, 2077, 2078, 2079, 2080, 2081, 2082, 2083, 2084, 2085, 2086, 2087, 2088, 2089, 2090, 2091, 2092, 2093, 2094, 2095, 2096, 2097, 2098, 2099, 2100, 2101, 2102, 2103, 2104, 2105, 2106, 2107, 2108, 2109, 2110, 2111, 2112, 2113, 2114, 2115, 2116, 2117, 2118, 2119, 2120, 2121, 2122, 2123, 2124, 2125, 2126, 2127, 2128, 2129, 2130, 2131, 2132, 2133, 2134, 2135, 2136, 2137, 2138, 2139, 2140, 2141, 2142, 2143, 2144, 2145, 2146, 2147, 2148, 2149, 2150, 2151, 2152, 2153, 2154, 2155, 2156, 2157, 2158, 2159, 2160, 2161, 2162, 2163, 2164, 2165, 2166, 2167, 2168, 2169, 2170, 2171, 2172, 2173, 2174, 2175, 2176, 2177, 2178, 2179, 2180, 2181, 2182, 2183, 2184, 2185, 2186, 2187, 2188, 2189, 2190, 2191, 2192, 2193, 2194, 2195, 2196, 2197, 2198, 2199, 2200, 2201, 2202, 2203, 2204, 2205, 2206, 2207, 2208, 2209, 2210, 2211, 2212, 2213, 2214, 2215, 2216, 2217, 2218, 2219, 2220, 2221, 2222, 2223, 2224, 2225, 2226, 2227, 2228, 2229, 2230, 2231, 2232, 2233, 2234, 2235, 2236, 2237, 2238, 2239, 2240, 2241, 2242, 2243, 2244, 2245, 2246, 2247, 2248, 2249, 2250, 2251, 2252, 2253, 2254, 2255, 2256, 2257, 2258, 2259, 2260, 2261, 2262, 2263, 2264, 2265, 2266, 2267, 2268, 2269, 2270, 2271, 2272, 2273, 2274, 2275, 2276, 2277, 2278, 2279, 2280, 2281, 2282, 2283, 2284, 2285, 2286, 2287, 2288, 2289, 2290, 2291, 2292, 2293, 2294, 2295, 2296, 2297, 2298, 2299, 2300, 2301, 2302, 2303, 2304, 2305, 2306, 2307, 2308, 2309, 2310, 2311, 2312, 2313, 2314, 2315, 2316, 2317, 2318, 2319, 2320, 2321, 2322, 2323, 2324, 2325, 2326, 2327, 2328, 2329, 2330, 2331, 2332, 2333, 2334, 2335, 2336, 2337, 2338, 2339, 2340, 2341, 2342, 2343, 2344, 2345, 2346, 2347, 2348, 2349, 2350, 2351, 2352, 2353, 2354, 2355, 2356, 2357, 2358, 2359, 2360, 2361, 2362, 2363, 2364, 2365, 2366, 2367, 2368, 2369, 2370, 2371, 2372, 2373, 2374, 2375, 2376, 2377, 2378, 2379, 2380, 2381, 2382, 2383, 2384, 2385, 2386, 2387, 2388, 2389, 2390, 2391, 2392, 2393, 2394, 2395, 2396, 2397, 2398, 2399, 2400, 2401, 2402, 2403, 2404, 2405, 2406, 2407, 2408, 2409, 2410, 2411, 2412, 2413, 2414, 2415, 2416, 2417, 2418, 2419, 2420, 2421, 2422, 2423, 2424, 2425, 2426, 2427, 2428, 2429, 2430, 2431, 2432, 2433, 2434, 2435, 2436, 2437, 2438, 2439, 2440, 2441, 2442, 2443, 2444, 2445, 2446, 2447, 2448, 2449, 2450, 2451, 2452, 2453, 2454, 2455, 2456, 2457, 2458, 2459, 2460, 2461, 2462, 2463, 2464, 2465, 2466, 2467, 2468, 2469, 2470, 2471, 2472, 2473, 2474, 2475, 2476, 2477, 2478, 2479, 2480, 2481, 2482, 2483, 2484, 2485, 2486, 2487, 2488, 2489, 2490, 2491, 2492, 2493, 2494, 2495, 2496, 2497, 2498, 2499, 2500, 2501, 2502, 2503, 2504, 2505, 2506, 2507, 2508, 2509, 2510, 2511, 2512, 2513, 2514, 2515, 2516, 2517, 2518, 2519, 2520, 2521, 2522, 2523, 2524, 2525, 2526, 2527, 2528, 2529, 2530, 2531, 2532, 2533, 2534, 2535, 2536, 2537, 2538, 2539, 2540, 2541, 2542, 2543, 2544, 2545, 2546, 2547, 2548, 2549, 2550, 2551, 2552, 2553, 2554, 2555, 2556, 2557, 2558, 2559, 2560, 2561, 2562, 2563, 2564, 2565, 2566, 2567, 2568, 2569, 2570, 2571, 2572, 2573, 2574, 2575, 2576, 2577, 2578, 2579, 2580, 2581, 2582, 2583, 2584, 2585, 2586, 2587, 2588, 2589, 2590, 2591, 2592, 2593, 2594, 2595, 2596, 2597, 2598, 2599, 2600, 2601, 2602, 2603, 2604, 2605, 2606, 2607, 2608, 2609, 2610, 2611, 2612, 2613, 2614, 2615, 2616, 2617, 2618, 2619, 2620, 2621, 2622, 2623, 2624, 2625, 2626, 2627, 2628, 2629, 2630, 2631, 2632, 2633, 2634, 2635, 2636, 2637, 2638, 2639, 2640, 2641, 2642, 2643, 2644, 2645, 2646, 2647, 2648, 2649, 2650, 2651, 2652, 2653, 2654, 2655, 2656, 2657, 2658, 2659, 2660, 2661, 2662, 2663, 2664, 2665, 2666, 2667, 2668, 2669, 2670, 2671, 2672, 2673, 2674, 2675, 2676, 2677, 2678, 26

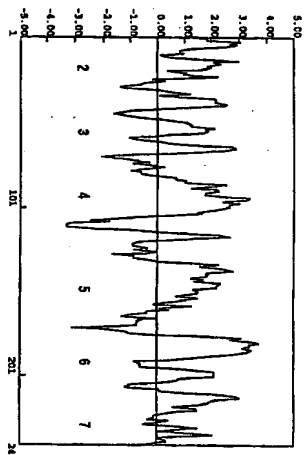
プター蛋白質cDNAクローニングpPB5002に含有するレセプター蛋白質cDNA断片の塩基配列およびそのコードされるアミノ酸配列を示す。下線で示した塩基配列はPCR増幅に用いた合成プライマーに相当する部分である。

【図2】図1に示したアミノ酸配列をもとに作成した。

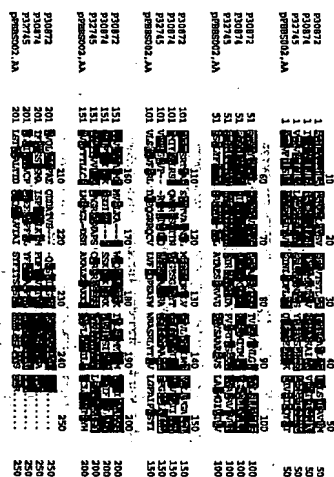
【図1】



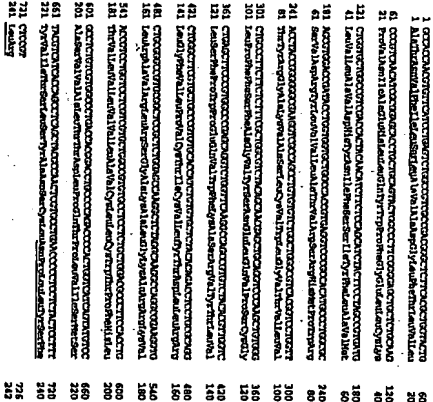
【図2】



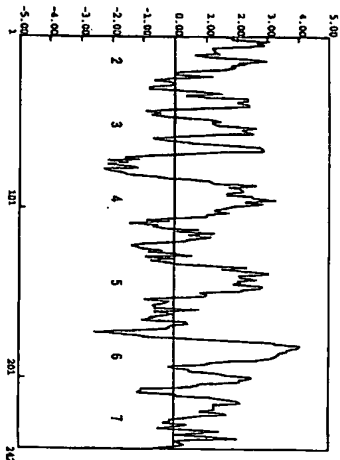
【図3】



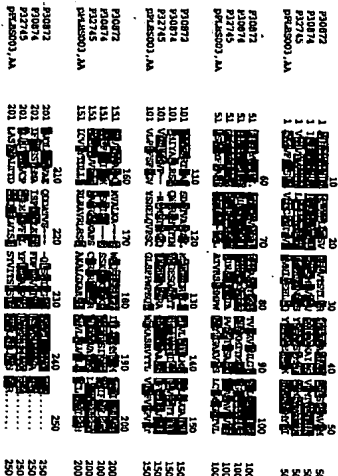
【図4】



【図5】



【図6】

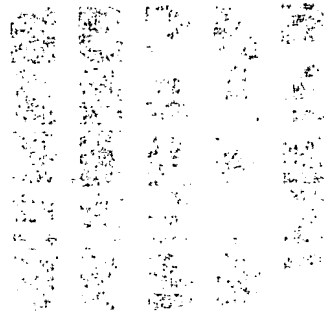


フロントページの続き

(31)Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I 技術表示箇所  
COIN 33/566  
// A61K 38/00 A61K 39/395  
39/395  
48/00  
C12Q 1/68 94S3-4B C12Q 1/68  
(C12N 1/21 A61K 37/02  
C12R 1:19)

(72)発明者 藤井 亮  
茨城県つくば市春日1丁目7番地の9 武  
田春日ハイッ303号

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**